

Toxicology

진달래 꽃에서 liquid chromatography-tandem mass spectrometry를 이용한 grayanotoxin의 검출

김선춘¹ · 김희중¹ · 심주현¹ · 장혜진¹ · 장문희¹ · 권은채² · 정종민² · 정성필³

¹국립과학수사연구원 독성학과, ²국립과학수사연구원 유전자과, ³연세대학교 의과대학 응급의학교실

Detection of grayanotoxin with liquid chromatography-tandem mass spectrometry from *Rhododendron mucronulatum*

Sun Cheun Kim¹, Heejung Kim¹, Juhyun Sim¹, Hye Jin Chang¹, Moonhee Jang¹,
Eunchae Kwon², Chong Min Choung², Sung Phil Chung³

¹Forensic Toxicology Division, National Forensic Service, Wonju, ²Forensic DNA Division, National Forensic Service, Wonju, ³Department of Emergency Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

일반적으로 진달래속(*Rhododendron*) 식물의 60% 이상이 grayanotoxin (GTX)를 함유하는 것으로 알려져 있다. GTX는 작용기에 따라 여러 아형이 있고, 진달래속 식물은 대표적으로 GTX I, II, III를 함유하고 있다. GTX는 주로 신경세포의 전압 개폐성 나트륨 채널에 과분극을 일으켜 독성을 나타내는데 저혈압, 서맥, 오심, 구토 등이 발생하고, 심하면 사망에 이르게 한다. 한국에 자생하는 진달래속 식물 중 GTX를 함유하는 것으로는 철쭉(*Rhododendron schlippenbachii*), 만병초 등이 알려져 있다.^{1,2} 한편 진달래(*R. mucronulatum*)는 식용 가능한 것으로 알려져 예로부터 음식이나 술로 섭취하였다. 그러나, 토끼에게 진달래 꽃잎 추출물을 투여한 실험에서 심근수축력과 심박동수의 감소 현상이 보고된 바 있다.³ 또한 몇몇 임상보고에서 진달래 꽃을 섭취한 후에 GTX 중독과 유사한 증상이 보고되었다.^{4,5} 이에 저자들은 한국에 자생하는 진달래와 철쭉 꽃에서 GTX의 함유 여부를 알아보고자 하였다.

실험에 이용된 꽃들은 원주, 청주, 강화 일대에서 채집되었다. 꽃에서 GTX를 추출하기 위해 각각의 시료를 2 mL의 증류수가 담긴 시험관에 넣고 10% HCl을 소량 첨가하여 산성 조건으로 만든 후 10분간 초음파 처리를 하였다. 이후 6 N NaOH를 이용해 알칼리성으로 액성을 바꾼 후 4 mL의 ethyl acetate을 추가하였다. 균질하게 혼합된 시료는 3,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 취해 질소

농축하였다. 시료분석은 액체크로마토그래피 텐덤질량분석기(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS; 4500 QTRAP, AB SCIEX coupled with Agilent 1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하였다. 메탄올로 재구성한 시료를 여과한(0.2 μ m, polyvinylidene fluoride) 후, LC-MS/MS에 2 μ L 주입하였다. 컬럼은 C18 column (Kinetex C18, 2.6 μ m, 50 mm \times 3 mm ID; Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였고, 이동상은 2 mM ammonium formate와 0.2% formic acid을 포함한 증류수와 아세트니트릴을 0.4 mL/min 유량에서 기울기 용리 조건으로 이용하였다(0-1 min 2% B, 1-6 min 100% B, 6-9 min 100% B, 9-9.1 min 2% B, 9.1-12 min 2% B, equilibrate for 2 min). 질량 분석은 전자분무 이온화(electrospray ionization) negative mode에서 수행되었고, GTX I의 multiple reaction monitoring 전이는 m/z 411.1 \rightarrow 369.2, 411.1 \rightarrow 351.1을, III는 m/z 369.1 \rightarrow 351.1, 369.1 \rightarrow 297.1의 Q1, Q3에서 각각 최적의 DP (declustering potential), EP (entrance potential), CE (collision energy), CXP (collision cell exit potential) 값을 이용하였다. 시료의 염색소 부분을 이용하여 진달래와 철쭉의 DNA identification을 수행하였다.

LC-MS/MS를 이용한 GTX 분석 결과 철쭉 꽃에서는 8건

책임저자: 정 성 필

서울특별시 강남구 언주로 211

연세대학교 의과대학 응급의학교실

Tel: 02-2019-3030, Fax: 02-2019-4820, E-mail: emstar@yuhs.ac

접수일: 2022년 7월 6일, 1차 교정일: 2022년 8월 6일, 게재승인일: 2022년 8월 8일

Capsule Summary

What is already known in the previous study

Azalea (Rhododendron mucronulatum) is known to be non-toxic due to the lack of grayanotoxins which are neurotoxins produced by most *Rhododendron* species such as royal azalea (*R. schlippenbachii*).

What is new in the current study

We found that some azalea with minor modifications in chloroplastid DNA contain grayanotoxins while the others don't. Consuming azalea flowers can cause grayanotoxin poisoning because of the toxic azalea.

모두 GTX가 검출되었다. 진달래의 경우에는 10건 중에서 GTX 양성이 4건이었고, 6건에서는 음성 또는 미량 함유로 나타났다(Fig. 1). 염기서열 분석 및 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 검색 결과 trnL-trnF, trnL intron, matK, ITS1-ITS4 4개 바코드 구간의 염기서열은 모두 동일하였으며, rbcL 바코드 구간에서는 중간 염기서열 차이를 보이는 Site <Y1, Y2>가 확인되었다(Fig. 2).

본 연구 결과 일부 진달래에서 GTX가 검출되어 진달래 꽃에 의한 GTX 중독이 일어날 수 있음을 확인하였다. GTX를 함유한 진달래를 육안으로는 구별할 수 없으므로 진달래를 식용해서는 안될 것으로 생각된다. 독성이 있는 진달래는 모두 강화도 고려산에서 채취한 시료로 해당 생

육환경은 철쭉과 진달래가 함께 생장하는 곳이었으며 나대지로 일광에 노출되는 곳이었다. 독성이 있는 진달래에서는 진달래와 철쭉의 염기서열이 모두 확인되었다. 진달래가 GTX를 생성하게 된 원인이 기후변화로 개화시기가 겹치면서 진달래와 철쭉의 유전형을 모두 갖는 4n 또는 2n 교잡종에 의한 것인지, 음식식물인 진달래가 양지에 자라면서 생기는 유전자 발현의 변화나 개체 변이 때문인지를 확인하는 연구와 함께 GTX를 함유하는 진달래의 국내 분포에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

ORCID

Sun Cheun Kim (<https://orcid.org/0000-0002-2769-8571>)

Heejung Kim (<https://orcid.org/0000-0003-1656-767X>)

Juhyun Sim (<https://orcid.org/0000-0002-5826-8494>)

Hye Jin Chang (<https://orcid.org/0000-0001-9669-6919>)

Moonhee Jang (<https://orcid.org/0000-0002-4837-1826>)

Eunchae Kwon (<https://orcid.org/0000-0001-5341-4037>)

Chong Min Choung (<https://orcid.org/0000-0003-3503-4078>)

Sung Phil Chung (<https://orcid.org/0000-0002-3074-011X>)

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

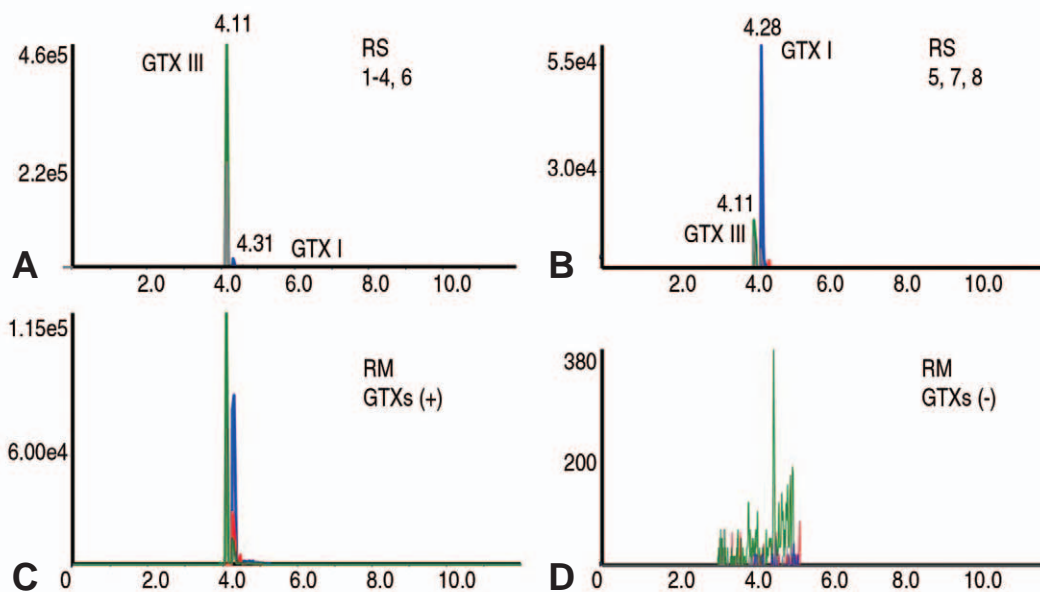


Fig. 1. Chromatogram of grayanotoxins (GTX) with liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. (A, B) *Rhododendron schlippenbachii* (RS) with GTX detected. (C) GTX-positive *R. mucronulatum* (RM). (D) GTX-negative RM.

Phenotype	Sample source	DNA identification
RS	Leaf, flower	<i>Rhododendron simsii</i>
RM	Leaf, flower	<i>Rhododendron mucronulatum</i>

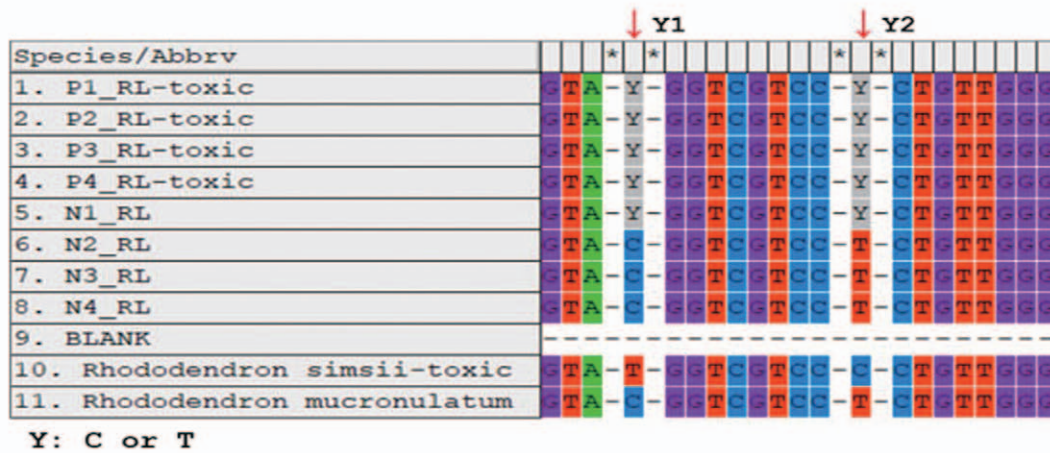


Fig. 2. Sequencing and basic local alignment search tool (BLAST) search result of *Rhododendron schlippenbachii* (RS) and *R. mucronulatum* (RM). Barcoding results of poisonous (P1-P4) and nontoxic (N1-N4) RM showed both DNA sequences of RM and *R. simsii* at Y1 and Y2 sites in P1-P4 and N1.

REFERENCES

- Jeong SM, Lee SH, Lim JS, et al. A case of systemic toxicity that occurred in an adult who intentionally ingested *Rhododendron schlippenbachii*. *J Korean Soc Clin Toxicol* 2009;7:180-2.
- Ohk TK, Kim YS, Park CW, et al. Two cases of *Rhododendron brachycarpum* intoxication. *J Korean Soc Clin Toxicol* 2006;4:143-6.
- Chun JH, Chung SB, Kang SH, et al. Toxic effect of azalea extract on cardiovascular system. *Yeungnam Univ Med J* 1991;8:52-62.
- Kim AJ, Kim JS, Shin DW, Baek KJ, Han SB, Lee YJ. Grayanotoxin intoxication: 3 case reports. *J Korean Soc Emerg Med* 2000;11:372-7.
- Kim HK, Jeong TO, Jin YH, Lee JB. Korean Rosebay intoxication: 2 case reports. *J Korean Soc Clin Toxicol* 2005;3:1:52-5.